

10/525974
PCT/JP03/05797

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.05.03

28 FEB 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 8月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-248909

[ST.10/C]:

[JP2002-248909]

出 願 人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

REC'D 27 JUN 2003

WIPO

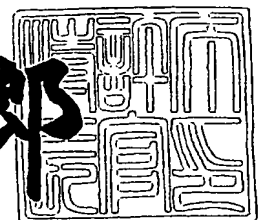
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3046248

【書類名】 特許願

【整理番号】 PS02-1190

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区小山台 2 - 5 - 5 - 1 1 3

 【氏名】 小倉 尚志

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢 1 - 1 - 1 0 小杉ビル 3 0 1

 【氏名】 黒岩 繁樹

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県赤穂郡上郡町光都 2 - 2 0 - 2、A - 2 2

 【氏名】 吉川 信也

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100087631

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110249

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 下田 昭

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 011017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第 1 段階、第 1 段階で生成した混合物を 7 0 ～ 2 7 0 K に冷却して凍結する第 2 段階、第 2 段階で生成した凍結混合物に 7 0 ～ 2 7 0 K で前記金属錯体の吸収波長を含む波長の光を照射する第 3 段階、及び第 3 段階で生成した凍結混合物を 8 0 ～ 2 7 0 K であって第 3 段階の温度より高い温度へ昇温する第 4 段階から成る酸化還元酵素の反応中間体を捕捉する方法。

【請求項 2】 第 2 段階において第 1 段階で生成した混合物を、前記基質が該混合物中で拡散を開始する温度（以下「拡散開始温度」という。）より低い温度に冷却し、第 3 段階において第 2 段階で生成した凍結混合物に拡散開始温度より低い温度で光を照射し、第 4 段階において第 3 段階で生成した凍結混合物を、拡散開始温度以上、但し 2 7 0 K 以下の温度へ昇温する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 第 3 段階において第 2 段階で生成した凍結混合物に拡散開始温度より 5 ～ 2 0 K 低い温度で光を照射し、第 4 段階において第 3 段階で生成した凍結混合物を、拡散開始温度～拡散開始温度 + 5 0 K の範囲の温度、但し 2 7 0 K 以下の温度へ昇温する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 更に、第 4 段階で生成した凍結混合物を拡散開始温度より低い温度に冷却する第 5 段階を含む請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

この発明は、チトクロム c 酸化酵素等の酸化還元酵素と基質との反応中間体を捕捉する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

チトクロムc酸化酵素等の何らかの酸化還元反応を触媒する酵素の、酸化還元過程の中間体を捕捉することは、その反応機構を解明する上で極めて重要であるため、従来様々な試みがなされている。

例えば、還元型チトクロムc酸化酵素に阻害剤として一酸化炭素を作用させて不活性化した後、 -25°C 程度の低温で酸素を加え、さらに低温にして凍結し、これに光を照射することにより阻害剤である一酸化炭素を解離させて、酸素との反応中間体を捉えることが報告されている (Chance, B., Saronio, C., Leigh, Jr., J. S., Ingledew, W. J., and King, T. E. (1978) *Biochem. J.*, 171, 787-798)。この場合、阻害剤が副反応を起こす可能性を否定できず、また適切な阻害剤が存在しない酵素には適用できない。また、対象が結晶タンパク質の場合、基質を迅速に混合することは困難である等の問題があった。

【0003】

また、室温で光照射により電子を放出する試薬であるルテニウム錯体を用いてチトクロムc酸化酵素を光還元することが報告されている (Scott, R. A. and Gray, H. B. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 3219-3224)。しかし、このような試薬を用いて上記文献のように低温で凍結して反応中間体を捕捉しようとしても、室温と違って試薬の拡散がないため光還元の効率が非常に悪いという問題がある。

また従来は、主として時間分解の分光学的測定を行って酵素と基質の反応中間体について議論していた。また、反応開始前や反応終了後などの結晶タンパク質を用いたX線結晶構造解析の結果から反応中間体のタンパク質の構造に関して推論を行っていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、酸化還元酵素と基質を含む水溶液が凍結するような低温において、光照射により電子を放出する光励起還元剤によりチトクロムc酸化酵素等の酸化還元酵素を十分に還元し、酸化還元酵素の反応中間体を確実に捕捉する方法であって、従来のように酵素の阻害剤を用いることなく、結晶状態の酵素の反応中間体も低温捕捉の対象とすることができる方法を提供する。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、基質を含む酵素溶液を低温で反応させ、そのために光照射により電子を放出する試薬を用い、これに光を照射して、酵素を還元することにより反応を開始させる。この反応を低温で行うため、試薬の拡散がほとんどなく光還元の効率が悪いが、光化学反応試薬に電子を供給するアミン系電子供与体を用いることで完全に還元できる条件を見出した。このようにして酸化還元酵素の反応中間体を確実に捕捉することに成功した。

本発明の方法においては、阻害剤による副反応を避け、また適切な阻害剤が存在しない酵素にも適用するために、阻害剤を使用せずに酵素と基質との反応を低温で開始させ、反応中間体を低温で捕捉する。この場合、基質を酵素と混合する時点では反応は起こらないので迅速に混合する必要がなくなり、対象が結晶タンパク質でも良く、将来反応中間体のX線結晶構造解析を行うための道が開ける。

【0006】

即ち、本発明は、酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第1段階、第1段階で生成した混合物を70～270Kに冷却して凍結する第2段階、第2段階で生成した凍結混合物に70～270Kで前記金属錯体の吸収波長を含む波長の光を照射する第3段階、及び第3段階で生成した凍結混合物を80～270Kであって第3段階の温度より高い温度へ昇温する第4段階から成る酸化還元酵素の反応中間体を捕捉する方法である。

【0007】

【発明の実施の形態】

第1段階では、酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質の各成分を水に溶解させる。このうち基質が気体の場合には他の成分を混合した溶液に、後で別途この気体を吹き込んでよい。

酸化還元酵素は、何らかの酸化還元反応を触媒する酵素であり、国際生化学連合（IUB）の酵素委員会によって定められた酵素分類の主群の1つEC1群で

ある。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ、一酸化窒素還元酵素、脱窒素酵素群（硝酸レダクターゼ、亜硝酸レダクターゼ、酸化窒素レダクターゼ、亜酸化窒素レダクターゼ）、P450スーパーファミリー（P450nor, P450sc, P450camなど）、キノール酸化酵素、ミトコンドリア内膜電子伝達系酵素（複合体 I, 複合体II, チトクロムbc₁複合体, チトクロムc酸化酵素など）、光合成電子伝達系酵素（チトクロムb₆f複合体、Fd-NADP⁺レダクターゼなど）、酸素添加酵素（トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ, フェニルアラニン4モノオキシゲナーゼなど）、ヒドロペルオキシダーゼ（カタラーゼ、ペルオキシダーゼ）などが挙げられ、上記酵素及びそれらのアミノ酸の点変異体も含まれる。水溶液中の酸化還元酵素の濃度は約 1 μM ~ 10 mM である。

【0008】

光照射により電子を放出する光励起還元剤として、例えば、ルテニウム錯体（ $[\text{Ru}(\text{bipyridine})_3]^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ など）のような遷移金属錯体、炭化水素類（ペリレン及びその誘導体、ピレン及びその誘導体など）、各種色素（ポルフィリン（Zn、Mg 及び金属イオンを持たないもの）、pH 指示薬（メチレンブルー、アクリジンオレンジなど）、メチルビオローゲンなど）が挙げられる。

例えば、 $[\text{Ru}(\text{bipyridine})_3]^{2+}$ には 452 nm 及び 426 nm に吸収ピークがあるので、これらの波長が含まれる光を照射し、これを励起する。水溶液中の光励起還元剤の量は酵素の還元当量の 2 ~ 10 倍ほどの濃度が必要であり、低温では光還元の効率が悪いいため余分に試薬が必要となるため、その濃度は約 1 μM ~ 100 mM である。

【0009】

基質は、上記酸化還元酵素によって触媒作用を受ける化合物であり、電子を受け取ることによって還元される物質である。キノール酸化酵素及びチトクロムc酸化酵素の場合は酸素、一酸化窒素還元酵素の場合は一酸化窒素、P450スーパーファミリーの場合は酸素と一酸化炭素や有機化合物（例えば、コレステロール、ショウノウなど）である。また、酵素本来の生理的基質以外の電子受容体を用いてもよい。水溶液中の基質の濃度は約 1 μM ~ 20 mM である。

【0010】

アミン系電子供与体は、光励起還元剤が電子を放出した後に酸化型となった光化学反応試薬へ電子を供給して再生する、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基等を有するアミン系化合物である。このアミン系電子供与体は、基質や酵素へ行った電子が再び光化学反応試薬に戻る反応を防ぐ役割を持ち、比較的安定だが光化学反応試薬によって電子を奪われる。アミン系電子供与体として、例えば、エチレンジアミン四酢酸、トリエタノールアミン、L-システイン、アニリン、N, N-ジメチルアニリン等が挙げられる。これらを複数組み合わせ用いてもよい。水溶液中のアミン系電子供与体の濃度は約 1 mM ~ 100 mM である。

【0011】

この水溶液は、必要に応じて、更に、pH緩衝剤、可溶化剤、その他の試薬を含んでもよい。

pH緩衝剤としては、リン酸緩衝液やGoodの緩衝液などを用いてもよく、上記酸化還元酵素が正常に機能できる範囲内にpHを保つ（pH1~14）役割をする。pH緩衝剤の濃度は光励起還元剤の反応に伴うpH変化を抑えるために光励起還元剤の濃度よりも高いほうがよく、1~200 mM程度である。

可溶化剤としては、上記酸化還元酵素が水溶性タンパク質ではない場合、可溶化剤として界面活性剤（n-decyl- β -D-maltopyranoside、n-dodecyl- β -D-maltopyranoside、コール酸、Triton X-100 など）を用いてもよい。その濃度は0~1%（W/V）程度である。

なお、各成分の濃度は目的の酵素が正常に機能できる範囲内の濃度に適宜調整することが望ましい。

【0012】

第2段階では、第1段階で生成した混合液を冷却し凍結させる。この温度は70 K ~ 270 K、つまり水溶液が凍っている温度で光還元が可能な温度である。この温度は、基質が混合物中で拡散を開始する温度（「拡散開始温度」という。）より低い温度にすることが好ましいが、液体窒素温度（77 K）とすることが簡便である。拡散開始温度は、基質固有の温度であり、本発明のような条件下ではほぼ一定である。拡散開始温度は、例えば、本実施例等のデータより知ることができるが、酸素の場合には170 K、一酸化炭素の場合には140~170 K

の間である。

【0013】

第3段階では、凍結混合物に光を照射する。光励起された光励起還元剤は電子を放出し、酸化還元酵素は電子を受け取り、還元される。この段階の温度は、第2段階と同じでもよいが、基質との反応が進行しないという観点から温度拡散開始温度より低い温度が好ましく、更に、この範囲内でできるだけ高いほうが、還元反応促進から好ましい。従って、この段階の温度は、好ましくは拡散開始温度より低い温度、より好ましくは拡散開始温度から5～20 K低い温度である。

【0014】

第4段階では、前段階よりも昇温して、還元型の酸化還元型酵素と基質とを反応させて、反応中間体を形成させる。但し、余り温度を高くすると反応が進行して、反応中間体の状態に留まることが出来ないため、拡散開始温度以上のできるだけ低い温度が好ましい。従って、この段階の温度は、前段階の温度よりも高い温度であって、好ましくは拡散開始温度以上、但し270 K以下の温度、より好ましくは拡散開始温度～拡散開始温度+50 Kの範囲の温度、更に好ましくは拡散開始温度～拡散開始温度+30 Kの範囲の温度、最も好ましくは拡散開始温度にする。

本発明の方法においては、第4段階の後に、この段階で生成した凍結混合物を拡散開始温度より低い温度に冷却する第5段階を付加してもよい。反応中間体を保持するためである。この温度は通常液体窒素温度（77 K）とすることが簡便である。

【0015】

【発明の効果】

(1) 本発明の方法は、以下のようにタンパク質工学へ応用することができる。

既存の酵素タンパク質でも同様であるが、将来人工的に酸化還元反応を伴って機能する酵素を設計した場合、低温で反応中間体を捉える技術は重要となる。これによって酵素の機能を検定・評価する場合にX線結晶構造解析を行って反応途中の酵素の構造を決定することが容易になる。

従来技術では反応中間体を固定できる酵素は、酵素自身で低温で光化学反応を

開始できるものを除けば、阻害剤又は改変した基質がうまく利用できるものに限られていた。それ以外には、反応中間状態で反応が停止してしまうように酵素本体を改変してしまうしかなかった。しかし、タンパク質自体に手を加えた場合構造が変わってしまう可能性も否定できず、都合の良い改変方法もあるとは限らなかった。この場合、分光学的手法を用いて議論するしかないが、分光学的手法をもってしても反応中のタンパク質のあらゆる部分の構造変化までは情報を得られるわけではない。

本発明は、阻害剤や酵素の改変等を必要としない反応中間体固定法であり、利用可能な酵素の範囲が広がった。また、光感受性のより高い光化学反応試薬、光化学反応試薬と電子供与体を結合させた試薬等を開発することによって、低温でパルス光を用いて1電子だけを酵素に与え、1電子分ごとの反応を起こさせて酵素反応を段階ごとに検査することが可能になることも期待できる。

【0016】

(2) また本発明の方法は、低温酸素検出装置に利用することができる。

酸素を基質とする酵素を用いて、酸素電極が利用できない、溶液が凍っている状態で微量の酸素の濃度を検出する装置を作ることができる。

(3) 更に、本発明の方法は、微量一酸化窒素検出装置に応用することができる。

生体内で生じる一酸化窒素は不安定であるが、生体試料と一酸化窒素還元酵素(酸化型)と光化学反応試薬等をすばやく混合した後、凍結して光還元を行い、温度を上げて一酸化窒素と反応させることによって、分光学的に微量の一酸化窒素を検出することができる。

【0017】

【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

実施例 1

本実施例では、以下の手順で、チトクロムc酸化酵素が基質(酸素)を還元する反応中間体を捕捉した。

(1) 0.2 % n-decyl- β -D-maltopyranoside (Anatraceより購入) を含む 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 6. 8) にチトクロム c 酸化酵素 (既報(Yoshikawa et al. (1977) Journal of Biological Chemistry, 252, 5498-5508)に記載の方法に従って調製した。) 2 0 μ M を溶かす。

(2) (1) の溶液に酸素を吹き込んで飽和させる。

(3) (2) の溶液にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (和光純薬製) とアニリン (関東化学製) をそれぞれ 2 0 m M と 5 m M になるように添加する。

(4) (3) の溶液に暗所で tris(2,2'-bipyridine)dichlororuthenium(II) (Sigmaより購入) 1 0 0 μ M を添加した後、液体窒素中で凍結する。

(5) (4) の溶液の温度を 1 4 0 K に上げて 1 5 0 W ハロゲンランプで 4 時間光照射を行う (波長範囲: 400~800 nm、積算光エネルギー: $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ J)。

【0018】

このときの吸収スペクトルを図 1 に示す。(A) に示すように、6 0 3 n m 付近に吸収のピークが見られるが、この近辺には用いた試薬由来の吸収はなく、チトクロム c 酸化酵素の還元型の吸収のピークに一致している。光照射によってルテニウム錯体は光励起されて電子を放出し、チトクロム c 酸化酵素に電子を渡し、チトクロム c 酸化酵素は還元型となっている。

なお、電子を放出したルテニウム錯体は強力な酸化剤であり、このままでは還元型チトクロム c 酸化酵素から電子を奪う逆反応が起きて反応が前に進まない。室温の溶液中での反応では、適当に電子供与体となる物質を入れておくことで酸化型ルテニウム錯体を再還元していたが、低温で凍結していて分子の拡散が少ない状態では電子を酸化型ルテニウム錯体に渡すことが難しかったが、本発明においてはアミン系の電子供与体 (エチレンジアミン四酢酸とアニリンとの混合物) を使うことでこの問題を解決した。この結果、チトクロム c 酸化酵素の 1 0 0 % 光還元が完了した。

【0019】

(6) (5) で得たチトクロム c 酸化酵素の還元型を 1 8 0 K で 5 時間置いて酸素と反応させる。図 1 (B) に示すように吸収極大の移動が見られる。図 1 (C

) は (B) - (A) を計算したものである。

180 Kまで温度を上げると酸素分子が少しずつ拡散し始めて、還元型になったチトクロム c 酸化酵素の活性中心であるヘム a₃ のヘム鉄に酸素分子が結合する。その結果、酸素化型反応中間体である $\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$ (Fe^{3+} はヘム a₃ のヘム鉄) が生じる。図 1 (C) に示す酸素と反応後-反応前の差スペクトルの形状は酸素化型反応中間体として過去報告されてきたのものと一致する (Biochem. J., 171, 787-798 (1978)、T. Ogura et al. (1990) J. Am. Chem. Soc., 112, 5630-5631.)

【0020】

図 1 において、反応中間体 (B) と還元型酵素 (A) の差スペクトルを計算したところ、595 nm の付近に吸収の増加 (山) が見られ、606 nm 付近に吸収の減少 (谷) が見られた (C)。これは酸素を除いた嫌気的条件下では現れない。これは酸素との反応によって、反応前に 606 nm 付近に吸収があったものが反応後に 595 nm の付近に吸収が移動したことを示す。このことは還元型ヘム a₃ が酸素によって何かに変化したことを意味する。

Chance らの報告 (Biochem. J., 171, 787-798 (1978)) にあるように酸素化型反応中間体 (文献では compound A) が生じたときは 591 nm の付近に吸収の増加が見られ、611 nm 付近に吸収の減少が見られる。実験条件の違い (酵素標品の違い、可溶化剤の有無、測定温度の違い、生じた反応中間体の量の違い) を考慮に入れば、酸素化型反応中間体が生じたと考えられる。

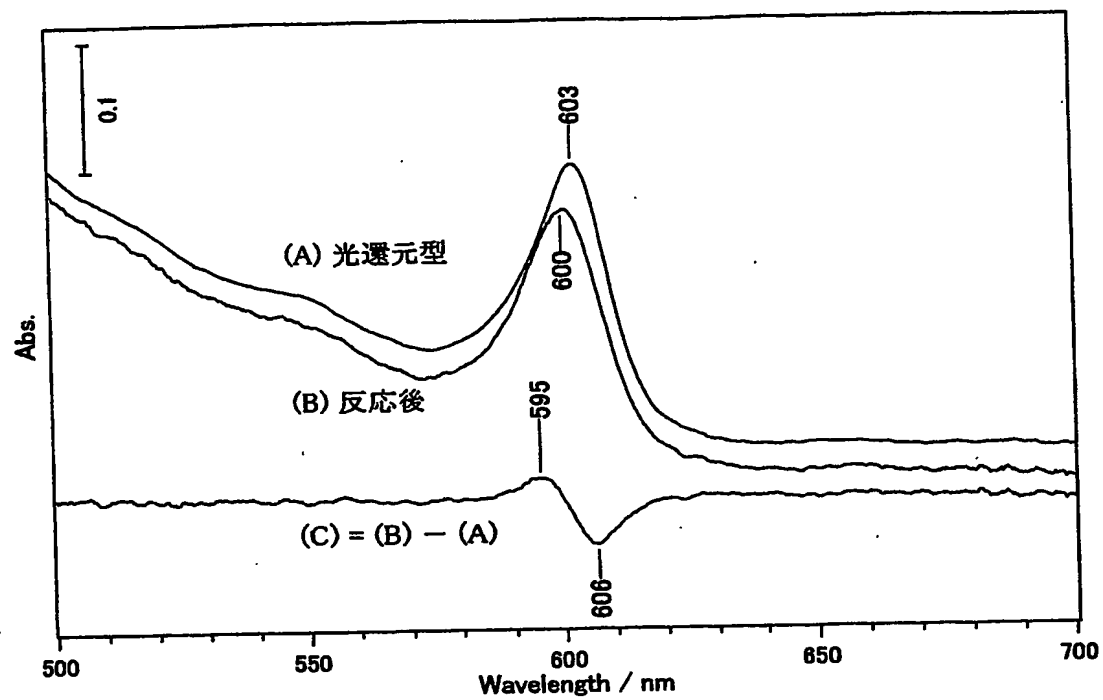
【図面の簡単な説明】

【図 1】

チトクロム c 酸化酵素の低温吸収スペクトルを示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 チトクロム c 酸化酵素等の酸化還元酵素の反応中間体を確実に捕捉する。

【解決手段】 酸化還元酵素、光照射により電子を放出する光励起還元剤、アミン系電子供与体、及び該酸化還元酵素の基質を水に溶解させ混合する第 1 段階、第 1 段階で生成した混合物を 7 0 ～ 2 7 0 K に冷却して凍結する第 2 段階、第 2 段階で生成した凍結混合物に 7 0 ～ 2 7 0 K で前記金属錯体の吸収波長を含む波長の光を照射する第 3 段階、及び第 3 段階で生成した凍結混合物を 8 0 ～ 2 7 0 K であって第 3 段階の温度より高い温度へ昇温する第 4 段階から成る酸化還元酵素の反応中間体を捕捉する方法である。

【選択図】 なし

特 2002-248909

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2002-248909

受付番号

50201279389

書類名

特許願

担当官

第八担当上席

0097

作成日

平成14年 8月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 8月28日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団